

# 鲈鱼肠道来源降胆固醇乳酸菌分离筛选 及其益生功能评价

宋莺丽<sup>1,2</sup>, 李安章<sup>1</sup>, 徐帅帅<sup>1</sup>, 马立安<sup>2</sup>, 朱红惠<sup>1\*</sup>

(1. 广东省科学院微生物研究所, 华南应用微生物国家重点实验室, 农业农村部农业微生物组学与精准应用重点实验室, 广东省菌种保藏与应用重点实验室, 广东广州 510070) (2. 长江大学生命科学学院, 湖北荆州 434025)

**摘要:** 该研究探讨了从健康鲈鱼肠道中筛选分离出高效降胆固醇的乳酸菌, 通过菌株鉴定、耐酸、耐胆盐、疏水性、自凝聚力和代谢物抑菌性评价的测定, 评价并考察其体外益生作用。采用胆盐水解酶测定和体外降胆固醇试验, 筛选分离得到一株高效降胆固醇的菌株 ZG2YLu05, 其胆盐水解酶 (BSH) 粗酶活和胆固醇去除率分别为 0.82  $\mu\text{mol}/(\text{h}\cdot\text{mL})$  和 50.09%; 在 pH 3.0 的培养条件下培养 8 h, 菌株的耐酸存活率为 83.33%; 在胆盐浓度 0.3% 的培养条件下培养 8 h, 菌株的耐胆盐存活率高达 89.31%; 在二甲苯中菌株的疏水性为 46.82%, 静置 24 h 后菌株的自凝聚力为 92.93%, 说明菌株具有良好的黏附潜力; 菌株代谢物对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和沙门氏菌都有明显的抑制作用; 经形态学观察和 16S rDNA 鉴定为戊糖乳杆菌 (*Lactiplantibacillus pentosus*)。该菌株能够作为潜在降胆固醇乳酸菌用于开发辅助降脂益生菌制剂的生产。

**关键词:** 胆盐水解酶; 降胆固醇; 益生作用; 戊糖乳杆菌; 加州鲈鱼

文章编号: 1673-9078(2022)08-44-52

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.8.1121

## Isolation, Screening, and Probiotic Function Evaluation of Lactic Acid Bacteria with Cholesterol-lowering Effects from the Intestinal Tract of Seabass

SONG Yingli<sup>1,2</sup>, LI Anzhang<sup>1</sup>, XU Shuaishuai<sup>1</sup>, MA Li'an<sup>2</sup>, ZHU Honghui<sup>1\*</sup>

(1. Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Key Laboratory of Agricultural Microbiomics and Precision Application, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, State Key Laboratory of Applied Microbiology Southern China, Institute of Microbiology, Guangdong Academy of Sciences, Guangzhou 510070, China)  
(2. College of Life Science, Yangtze University, Jingzhou 434025, China)

**Abstract:** This study focused on the screening and isolation of lactic acid bacteria with high-efficiency cholesterol-lowering effects from the intestines of healthy seabass. The assessments of *in vitro* probiotic effects were carried out through strain identification, together with the evaluation of acid resistance, bile salt tolerance, hydrophobicity, self-cohesion, and the antibacterial properties of their metabolites. Bile salt hydrolase (BSH) assays and *in vitro* cholesterol reduction tests were performed, which led to the isolation of a high-efficiency cholesterol-lowering strain ZG2YLu05. This strain exhibited crude BSH activity with a value of 0.82  $\mu\text{mol}/(\text{h}\cdot\text{mL})$ , and a cholesterol removal rate of 50.09%. The acid-resistance survival rate of the strain was 83.33% when cultured at pH 3.0 for 8 h, while the bile salt-tolerance survival rate was 89.31% when cultured in 0.3% bile salt concentration for 8 h. The hydrophobicity of the strain in dimethylbenzene was 46.82% and its

引文格式:

宋莺丽, 李安章, 徐帅帅, 等. 鲈鱼肠道来源降胆固醇乳酸菌分离筛选及其益生功能评价[J]. 现代食品科技, 2022, 38(8): 44-52

SONG Yingli, LI Anzhang, XU Shuaishuai, et al. Isolation, screening, and probiotic function evaluation of lactic acid bacteria with cholesterol-lowering effects from the intestinal tract of seabass [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(8): 44-52

收稿日期: 2021-10-09

基金项目: 广东省重点领域研发计划项目 (2018B020205002); 国家自然科学基金面上项目 (32070115)

作者简介: 宋莺丽 (1996-), 女, 硕士, 研究方向: 肠道微生物, E-mail: 1831586651@qq.com

通讯作者: 朱红惠 (1970-), 女, 博士, 研究员, 研究方向: 微生物资源发掘与创新利用, E-mail: zhuhh@gdim.cn

self-cohesion was 92.93% when left to stand for 24 h, which indicates that the strain has potentially good adhesion properties. The metabolites of the strain also showed significant inhibition of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Salmonella*. The strain was identified as *Lactiplantibacillus pentosus* through morphological observations and 16S rDNA sequencing. Therefore, this strain can be used as a potential cholesterol-lowering lactic acid bacteria for the development of complementary lipid-lowering probiotic preparations.

**Key words:** bile salt hydrolase; cholesterol lowering; probiotic effects; *Lactobacillus pentosus*; *Micropterus salmoides*

胆固醇与人的健康息息相关,是人体细胞重要的组成部分,同时也是诱发心血管疾病的危险因素之一。人体胆固醇浓度过高会诱发高脂血症,进而造成胆固醇动脉壁结块、动脉粥样硬化、冠心病、脑梗、中风等严重的心血管疾病<sup>[1]</sup>。调查表明,美国每年由心血管疾病造成的经济损失高达 3154 亿美元<sup>[2]</sup>。据统计,预计至 2030 年,全球范围内死于心血管疾病的人数将达到约 3000 万左右<sup>[3]</sup>。虽然近年来治疗高脂血症及其相关的心血管疾病的药物不断涌现,但是这些药物普遍价格昂贵且伴有严重的副作用,长期疗效并不显著<sup>[4,5]</sup>。

益生菌是一类能定植于宿主体内且有利于宿主健康的活性微生物的总称<sup>[6]</sup>。乳酸菌因能产生抑制有害微生物的物质且有利于宿主肠道健康而作为常见的益生菌,被广泛应用于食品、保健品以及医药行业中<sup>[7]</sup>。早在 2001 年,世界卫生组织就提出了益生菌可有效治疗高脂血症<sup>[8]</sup>,它不仅可以降低机体的血脂水平,还能调节肠道菌群的平衡,从而降低心脑血管疾病发病的风险<sup>[9-11]</sup>。以上研究表明,筛选出具有降胆固醇功能的菌株是近几年的研究热点。黄燕燕等<sup>[12]</sup>、李雅迪等<sup>[13]</sup>利用体外筛选试验证实益生菌具有体外降胆固醇的作用;Fei 等<sup>[14]</sup>、El-Gawad 等<sup>[15]</sup>、Zhu 等<sup>[16]</sup>利用动物模型证明了益生菌具有体内降胆固醇的作用;Jones 等<sup>[17-19]</sup>、Liong 等<sup>[20,21]</sup>利用一系列体外和体内试验证明了益生菌可降低机体中胆固醇的含量。益生菌降胆固醇的作用机制主要有两个观点:一个是 Frand 等<sup>[22]</sup>最先提出的共沉淀理论,即胆盐水解酶能将结合型胆盐水解成游离型胆盐,游离型胆盐可与胆固醇共沉淀排出体外,从而达到降低胆固醇的目的;另一个是 Gilliland 等<sup>[23]</sup>提出的同化吸收理论,即胆固醇能被乳酸同化并吸附在细胞膜表面,从而降低体内胆固醇的含量。

本研究从健康鲈鱼肠道中筛选既能产胆盐水解酶又能降胆固醇的乳酸菌,并对其进行菌株鉴定,通过耐酸、耐胆盐及抑菌性等指标评估菌株的益生作用,为后续体内试验及辅助降脂益生菌制剂的生产提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 样品

筛选目标菌株的样品取自本实验室养殖的健康鲈鱼肠道内容物,植物乳杆菌(GDMCC 1.140)、大肠杆菌(GDMCC 1.180)、金黄色葡萄球菌(GDMCC 1.1220)、沙门氏菌(GDMCC 1.237)由广东省微生物菌种保藏中心(GDMCC)提供。

#### 1.1.2 培养基

MRS 肉汤培养基:广东环凯微生物有限公司;

MRS 固体培养基:在 MRS 肉汤培养基中添加 2% 的琼脂;

BSH 筛选培养基:在 MRS 肉汤培养基中添加琼脂 2%,牛胆盐 0.3%,巯基乙酸钠 0.2%,氯化钙 0.037%;

MRS-CHOL 培养基:在 MRS 肉汤培养基中添加 3%胆盐和 1%胆固醇。

#### 1.1.3 试剂与仪器

牛胆盐、革兰氏染液,广东环凯微生物有限公司;巯基乙酸钠、胆固醇,上海麦克林生化科技有限公司;二硫苏糖醇、茚三酮,北京索莱宝科技有限公司;牛磺酸、牛磺胆酸钠、邻苯二甲醛,上海阿拉丁生化科技股份有限公司;三氯乙酸,国药集团化学试剂有限公司;细菌 DNA 抽提试剂盒,广州美基生物科技有限公司;氯化钙、氯仿、二甲苯,广州化学试剂厂。

HVE-50 高压蒸汽灭菌器,日本 Hirayama 公司;SW-CJ-2FD 洁净工作台,苏州安泰空气技术有限公司;AEP 厌氧工作箱,英国 Electrotek 公司;LRH-250 生化培养箱,上海浦东荣丰科学仪器有限公司;3-18KS 台式冷冻离心机、GSX1 梯度 PCR 仪,德国 Sigma 公司;Multiskan Go 酶标仪,上海巴玖实业有限公司;VCX-130 超声波细胞破碎仪,美国 Sonics 公司;电泳仪,北京六一生物科技有限公司;ST3100 pH 计,奥豪斯仪器(常州)有限公司。

## 1.2 试验方法

### 1.2.1 菌株的分离与纯化

取 1 g 新鲜的样品放入 9 mL 灭菌生理盐水中,混合摇匀后将所得到的样品悬浊液按 10 倍梯度稀释,选取合适的 3 个稀释梯度,吸取 100  $\mu$ L 涂布于 MRS 固体培养基上,37  $^{\circ}$ C 厌氧培养 48 h。观察涂布平板的菌

落形态特征,选择生长有 50~150 个单菌落的平板,根据菌落的形态特征选择不同形态的单菌落,在 MRS 平板上多次划线纯化,直至获得菌落形态特征一致的纯培养单菌。将分离纯化出来的菌株用 25% (体积分数) 的甘油于 -80 °C 冷冻保存。

## 1.2.2 产胆盐水解酶 (BSH) 菌株的定性筛选与酶活力测定

### 1.2.2.1 产 BSH 菌株的定性筛选

参考滕跃等<sup>[24]</sup>、玛丽娜·库尔曼等<sup>[25]</sup>定性筛选产 BSH 菌株的方法,将含有目标菌株的 BSH 筛选培养基 37 °C 培养 72 h,若观察到滤纸片周围产生白色沉淀,则说明该菌株产生 BSH。同时,以不产生 BSH 菌株作为阴性对照,以菌株 GDMCC 1.140 作为阳性对照。

### 1.2.2.2 产 BSH 菌株的酶活力测定

将菌株按 3% 的接种量接种于 MRS 肉汤培养基中,37 °C 培养 24 h 后离心 10 min (8000 r/min, 4 °C) 收集菌体,将收集的菌体用 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 7.0) 洗涤 2 次,在 600 nm 下调整菌体浓度为 1.0 后备用。参考 Tanaka 等<sup>[26]</sup>、李昵等<sup>[27]</sup>的方法测定菌株 BSH 酶活力,菌株 GDMCC 1.140 作为阳性对照,以牛磺酸浓度 ( $\mu\text{mol/mL}$ ) 为横坐标,吸光值 ( $A_{570\text{nm}}$ ) 为纵坐标,制得牛磺酸标准曲线为:  $y=0.2286x-0.0041$ ,  $R^2=0.9923$ 。

BSH (总) 酶活定义为:单位时间、单位体积的粗酶使结合胆盐水解产生氨基酸的物质的量,单位:  $\mu\text{mol}/(\text{h}\cdot\text{mL})$

## 1.2.3 体外降胆固醇能力测定

### 1.2.3.1 胆固醇标准曲线的绘制

参考贺珊珊等<sup>[28]</sup>的方法,以胆固醇的浓度 ( $\text{mg/mL}$ ) 为横坐标,吸光值 ( $A_{500\text{nm}}$ ) 为纵坐标,制得胆固醇标准曲线为:  $y=24.393x-0.0125$ ,  $R^2=0.9944$ 。

### 1.2.3.2 样品的制备与测定

将上述产 BSH 的菌株活化后,用未接菌的 MRS 肉汤培养基在 600 nm 下调整菌体浓度为 1.0,调整后的菌悬液按照 3% 的接种量接种到 MRS-CHOL 培养基中,37 °C 培养 24 h,取 1 mL 发酵液,8000 r/min 离心 10 min 取上清液,以菌株 GDMCC 1.140 作为阳性对照,采用邻苯二甲醛法<sup>[29,30]</sup>测定上清液中胆固醇含量,按照公式 (1) 计算胆固醇去除率。

$$\text{胆固醇去除率} / \% = \frac{B-A}{B} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

B——接种菌株前培养基中胆固醇浓度;

A——菌株发酵后培养基中胆固醇浓度。

## 1.2.4 菌株鉴定

将挑选出的胆盐水解酶活性且体外降胆固醇能力较好的菌株进行形态学观察及 16S rDNA 鉴定。

### 1.2.4.1 形态学观察

将活化好的菌株进行革兰氏染色及简单染色,镜检观察菌株的形态并拍照做记录。

### 1.2.4.2 16S rDNA 鉴定

用 DNA 试剂盒提取基因组,采用通用引物 (27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' 和 1492R: 5'-ACGGCTACCTTGTTACGACT-3') 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为: DNA 模版 1  $\mu\text{L}$ , 2 $\times$ Taq PCR MasterMix 12.5  $\mu\text{L}$ , 上下游引物各 0.5  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 10.5  $\mu\text{L}$ , 总体积 25  $\mu\text{L}$ 。反应条件: 预变性: 94 °C、3 min; 变性: 94 °C、30 s; 退火: 55 °C、30 s; 延伸: 72 °C、1 min; 30 个循环; 4 °C 终止反应。反应结束后,取 3  $\mu\text{L}$  反应产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,将扩增合格的样品送天一辉远公司或金唯智公司测序。测序得到的 16S rDNA 序列使用 DNAMAN 8 软件进行拼接后,与 NCBI (National Center for Biotechnology Information) 数据库进行同源序列比对初步确定其属种,再利用 MEGA 7.0 构建系统发育树,进一步确定筛选得到的菌株与参比菌株之间的进化关系<sup>[31]</sup>。

## 1.2.5 菌株耐酸性测定

分别调整 MRS 肉汤培养基的 pH 为 3.0 和 6.0 (其中 pH 6.0 的培养基作为对照组),将菌种按 3% 的接种量分别接种于上述两种培养基中,37 °C 培养 0、2、4、6、8 h 取样,用酶标仪测定菌株的 OD<sub>600</sub> 值,按照公式 (2) 计算菌株的耐酸存活率<sup>[32]</sup>。

$$\text{菌株耐酸性存活率} / \% = \frac{\text{试验组 OD}_{600}}{\text{对照组 OD}_{600}} \times 100\% \quad (2)$$

## 1.2.6 菌株胆盐耐受性测定

以不加胆盐的 MRS 肉汤培养基为对照组,加入 0.3% 胆盐的 MRS 肉汤培养基为试验组,将菌株按 3% 的接种量分别接种于上述两种培养基中,37 °C 培养 0、2、4、6、8 h 取样,用酶标仪测定菌株的 OD<sub>600</sub> 值,按照公式 (3) 计算菌株的耐胆盐存活率<sup>[33]</sup>。

$$\text{菌株耐胆盐存活率} / \% = \frac{\text{试验组 OD}_{600}}{\text{对照组 OD}_{600}} \times 100\% \quad (3)$$

## 1.2.7 菌株疏水性的测定

参考 Kotzamanidis 等<sup>[34]</sup>的方法测定菌株的疏水性,在波长 600 nm 处测量其吸光度 A,按照公式 (4) 计算菌株的疏水率。

$$\text{疏水率} / \% = \frac{A_0 - A}{A_0} \times 100\% \quad (4)$$

式中:

$A_0$ ——与氯仿(或二甲苯)混合前菌液在波长 600 nm 处测量的吸光值;

$A$ ——与氯仿(或二甲苯)混合后菌液在波长 600 nm 处测量的吸光值。

### 1.2.8 菌株自凝聚力测定

参考温贺等<sup>[35]</sup>的方法测定菌株的自凝聚力,将菌液在试管中静置 1、24、48 h 后,取 1 mL 上清液测定光密度值,按照公式(5)计算菌株的自凝聚力:

$$\text{菌株自凝聚力}/\% = \left(1 - \frac{A_t}{A_0}\right) \times 100\% \quad (5)$$

式中:

$A_0$ ——时间为 0 h 时测得的光密度值;

$A_t$ ——时间分别为 1、24、48 h 时测得的光密度值。

### 1.2.9 代谢物抑菌性评价

参考何江波等<sup>[36]</sup>的方法,以大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和沙门氏菌为指示菌,用牛津杯法测定目标菌株的抑菌能力,将含有目标菌株的培养皿 37 °C 培养 24 h,观察并测量抑菌圈直径大小。

### 1.3 数据统计分析

采用 Excel 2010 和 Origin 2017 对数据进行整理和图表绘制,用 SPASS 19.0 进行差异显著性分析,当  $p < 0.05$  时,差异是有意义的,数据结果用平均值±标准差表示。

## 2 结果与讨论

### 2.1 产胆盐水解酶(BSH)菌株的定性筛选与酶活力测定

胆盐水解酶(BSH)能水解结合胆盐形成氨基酸和游离胆汁酸,游离胆汁酸能与胆固醇结合形成复合体排出体外,从而降低血液中胆固醇的含量。因此,胆盐水解酶可以作为降胆固醇菌株筛选的一个重要指标<sup>[37]</sup>。从鲈鱼肠道中共分离纯化出 30 株细菌,用 BSH 筛选培养基进行筛选,筛选结果在体视显微镜(SZX2-ILLT)下拍照观察,由图 1 可知,以不产 BSH 的菌株 ZGLLu02 和 ZR2YLu03 为阴性对照,以已报道的产 BSH 的菌株植物乳杆菌(GDMCC 1.140)为阳性对照,筛选出 9 株产 BSH 的菌株,菌株编号分别为 DM2YLu01、DM2YLu05、DMYLu01、DMYLu03、DMYLu07、SYLu7-2、YLu-1、ZG2YLu05、ZGYLu02。由图 2 可知,在 9 株产 BSH 的菌株中,ZG2YLu05 的 BSH 活性最高,其粗酶活为 0.82  $\mu\text{mol}/(\text{h}\cdot\text{mL})$ ,显

著高于阳性对照菌株 GDMCC 1.140 的粗酶活。

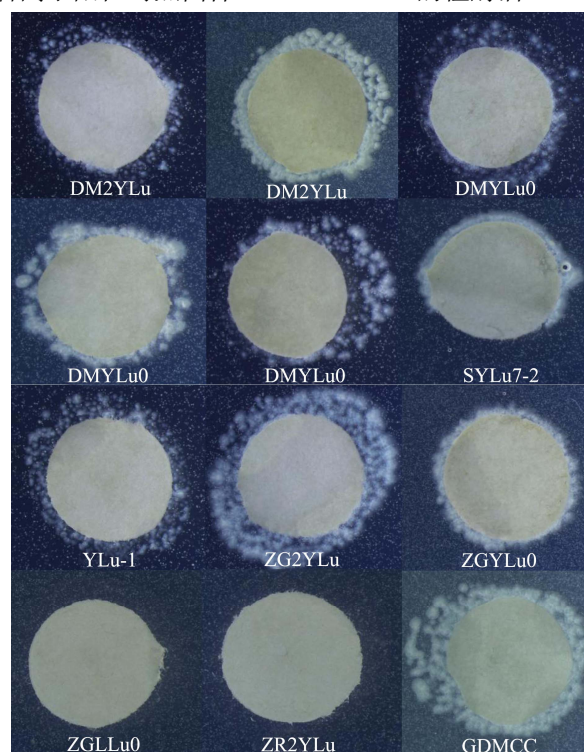


图 1 菌株胆盐水解酶的定性筛选

Fig.1 Qualitative screening of bile salt hydrolase from strains

注: 图片放大倍数为×1.25 倍。

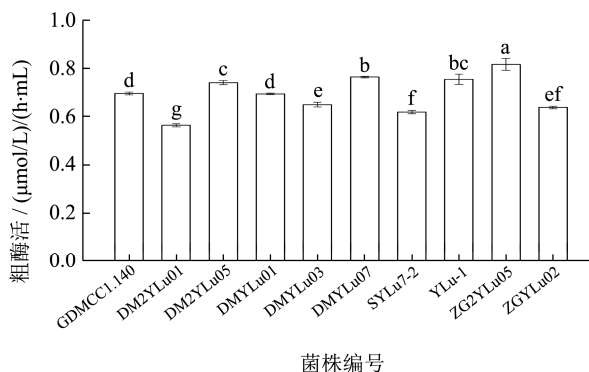


图 2 不同菌株胆盐水解酶的定量测定

Fig.2 Quantitative determination of bile hydrolase from different strains

注: 小写字母不同表示差异显著 ( $p < 0.05$ )。图 3 同。

### 2.2 体外降胆固醇能力测定

如图 3 所示,采用邻苯二甲醛法测定上述产 BSH 菌株的体外降胆固醇能力。其中胆固醇去除率小于 20%有 3 株菌,胆固醇去除率在 20%~30%有 5 株菌,胆固醇去除率高于 40%以上有 1 株菌,其中菌株 ZG2YLu05 的胆固醇去除率最高为 50.09%,显著高于阳性对照菌株 GDMCC 1.140 和其他菌株。关于降胆固醇乳酸菌的研究中,目前研究已发现多种不同的菌株,包括植物乳杆菌、嗜酸乳杆菌和鼠李糖乳杆菌等

多种菌株<sup>[24]</sup>。如万婧侗等<sup>[30]</sup>从喙鲸内脏中筛选出一株胆固醇去除率 48.82%的植物乳杆菌,黄燕燕等<sup>[12]</sup>从开菲尔粒和陈年泡菜水中筛选出一株胆固醇去除率 37.58%的植物乳杆菌。由此可见,在关于降胆固醇乳酸菌的现有研究中,菌株 ZG2YLu05 的胆固醇去除率处于较高水平,具有一定的研究价值,因此选取该菌株进行下一步试验。

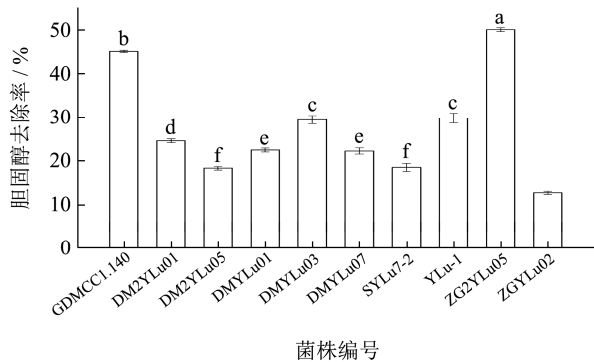


图3 不同菌株体外胆固醇去除率

Fig.3 In vitro cholesterol removal rate of different strains

### 2.3 菌株鉴定

#### 2.3.1 形态学观察

将菌株 ZG2YLu05 在 MRS 固体培养基上 37 °C 培养 48 h 后观察菌落形态,结果如图 4a、4b 所示,菌株 ZG2YLu05 的菌落直径约 0.5~2 mm,菌落湿润,为白色圆形,隆起,边缘光滑。挑取单个菌落进行革兰氏染色并在油镜 100×10 倍数下观察菌体形态,结

果如图 4c 所示,菌株细胞为短杆状,单个、成对或成串聚集,无芽孢,无鞭毛,为革兰氏阳性菌。

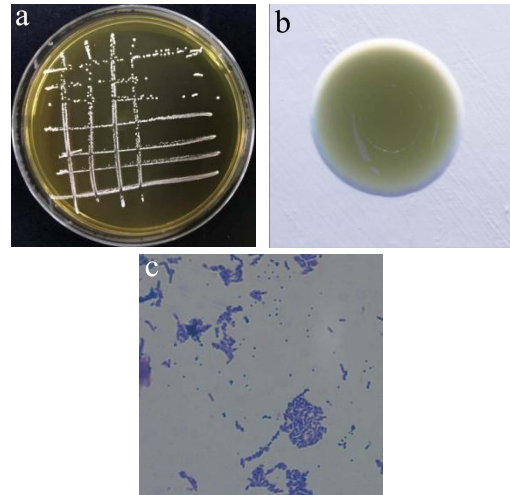


图4 菌株 ZG2YLu05 的形态学观察

Fig.4 Morphological observation of strain ZG2YLu05

注:(a)为菌落形态;(b)为体视镜下单个菌落形态;(c)为革兰氏染色后菌体形态。

#### 2.3.2 16S rDNA 鉴定

用试剂盒提取菌株 ZG2YLu05 的基因组后,用 16S rDNA 通用引物进行 PCR 扩增,扩增产物的序列长度在 1500 bp 左右,扩增产物的测序结果在 NCBI 上做同源序列比对,用 MEGA7.0 构建系统发育树,结果见图 5。系统发育树显示 ZG2YLu05 与戊糖乳杆菌的亲缘关系最近。因此,鉴定 ZG2YLu05 为戊糖乳杆菌。

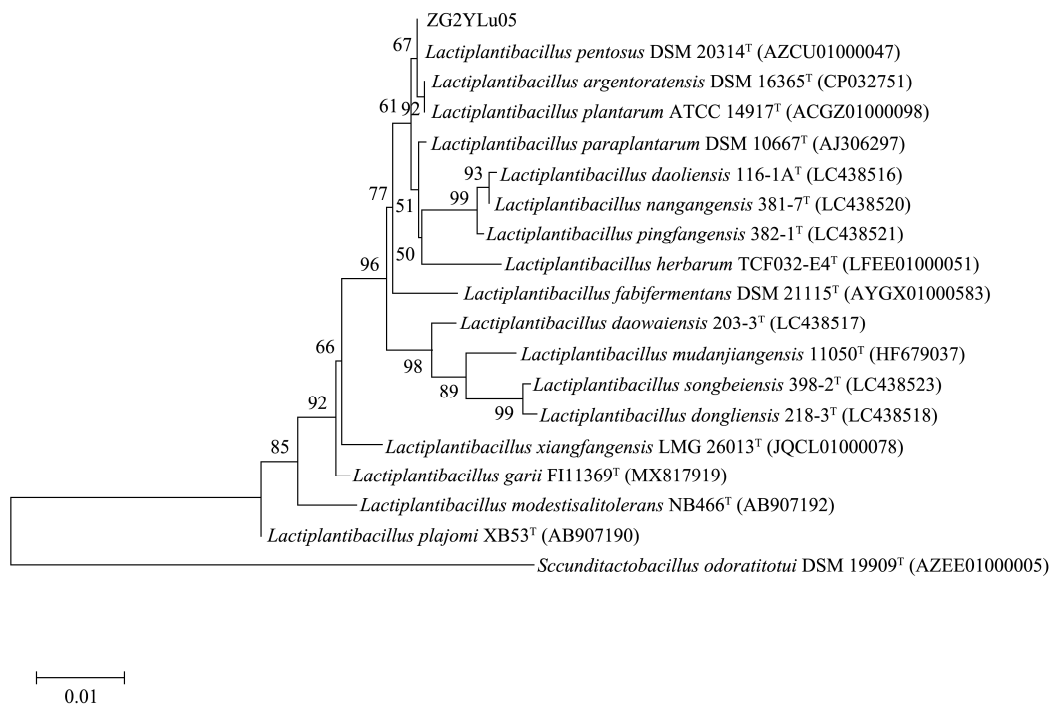


图5 菌株 ZG2YLu05 的系统发育树

Fig.5 Phylogenetic tree of strain ZG2YLu05



## 2.4 菌株耐酸性测定

通常人体进食后胃部 pH 在 3.0~5.0 之间<sup>[38]</sup>,且食物一般在胃中只停留 2~4 h<sup>[39]</sup>。如图 6 所示,菌株 ZG2YLu05 在 pH 3.0 的条件下,经过 8 h 的培养,其存活率仍高达 83.33%,说明菌株 ZG2YLu05 对低 pH 的酸性环境有很好的耐受性,由此判定此菌株可以适应人体肠道酸性环境并发挥作用。

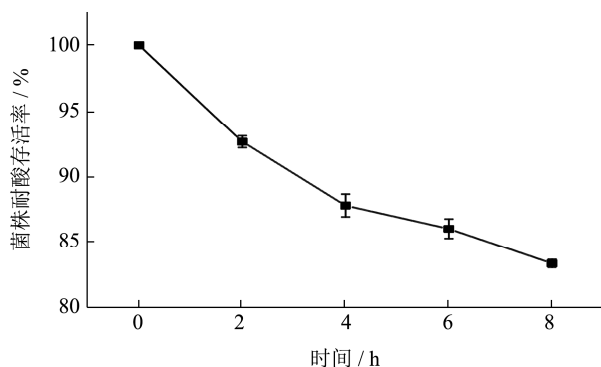


图 6 菌株 ZG2YLu05 的耐酸性测定

Fig.6 Determination of acid resistance of strain ZG2YLu05

## 2.5 菌株胆盐耐受性测定

有研究发现,适当的胆盐浓度会促进乳酸菌对胆固醇的吸收<sup>[40]</sup>,而人体肠道胆盐浓度一般在 0.03%~0.3%之间<sup>[41]</sup>,因此测定菌株胆盐耐受性是衡量菌株能否在肠道发挥作用的一个重要指标。如图 7 所示,菌株 ZG2YLu05 在胆盐浓度 0.3%的条件下,经过 8 h 的培养,其存活率仍高达 89.31%,说明菌株 ZG2YLu05 对胆盐有很好的耐受性,可以进入人体肠道并在其中发挥作用。

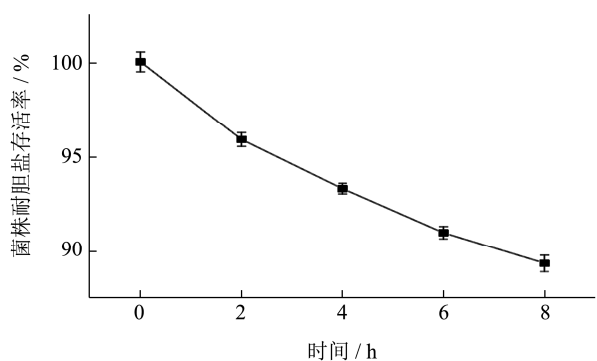


图 7 菌株 ZG2YLu05 的胆盐耐受性测定

Fig.7 Bile salt tolerance determination of strain ZG2YLu05

## 2.6 菌株疏水性的测定

疏水性和自凝聚力与菌株对肠上皮细胞的黏附能力有关<sup>[42]</sup>,有研究表明疏水性高的乳酸菌对肠上皮细胞具有强的黏附性<sup>[43]</sup>。分别以氯仿和二甲苯为吸附剂

研究菌株的疏水性,由表 1 可知,菌株 ZG2YLu05 在二甲苯中的疏水性比在氯仿中的疏水性高,达 46.82%,超过了陈明等<sup>[44]</sup>筛选的菌株疏水性(31.92%),说明菌株 ZG2YLu05 具有较好的疏水性,有一定的黏附能力。

表 1 菌株 ZG2YLu05 的疏水性测定

Table 1 Hydrophobicity determination of strain ZG2YLu05

项目	二甲苯	氯仿
疏水率/%	46.82±0.21	20.29±0.13*

注: \*表示差异显著 ( $p < 0.05$ )。

## 2.7 菌株自凝聚力测定

菌株的自凝聚力由疏水性决定,同时与上皮细胞的黏附能力有关<sup>[45]</sup>。由表 2 可知,菌株 ZG2YLu05 的自凝聚力随着时间的延长而提高,在静置 24 h 后,ZG2YLu05 的菌悬液上层明显呈现澄清状态,自凝聚力高达 92.93%,高于玛丽娜·库尔曼等<sup>[25]</sup>研究的副干酪乳杆菌 S-8 的自凝聚力(88.42%),说明菌株 ZG2YLu05 具有良好的自凝聚力,在肠道中可以稳定定植。

表 2 菌株 ZG2YLu05 的自凝聚力测定

Table 2 Determination of self-cohesion of strain ZG2YLu05

项目	1 h	24 h	48 h
自凝聚力/%	8.86±0.20	92.93±0.12	94.28±0.06

## 2.8 代谢物抑菌性评价

大量研究成果表明,乳酸菌会产生乳酸、乙酸、细菌素等代谢产物抑制肠道病原菌<sup>[46]</sup>。本研究以大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和沙门氏菌为指示菌,用牛津杯法评估菌株 ZG2YLu05 的抑菌能力。如表 3 所示,菌株 ZG2YLu05 对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和沙门氏菌都有明显的抑制作用,抑菌圈直径分别为 17.85、12.67 和 16.16 mm,其中对大肠杆菌的抑制能力最好,其次是沙门氏菌和金黄色葡萄球菌,说明菌株 ZG2YLu05 产生的代谢物质具有一定的抑菌活性,对肠道健康具有一定的促进作用。

表 3 菌株 ZG2YLu05 的抑菌性评价

Table 3 Evaluation of antibacterial activity of strain ZG2YLu05

项目	大肠杆菌	金黄色葡萄	沙门氏菌
抑菌圈直径/mm	17.85±0.44 <sup>a</sup>	12.67±0.31 <sup>c</sup>	16.16±0.17 <sup>b</sup>

注:小写字母不同表示差异显著 ( $p < 0.05$ )。

## 3 结论

3.1 血清中过高的胆固醇是引起动脉壁结块、动脉粥样硬化、脑梗、中风等心脑血管疾病的主要原因,而

乳酸菌作为常见的降胆固醇益生菌,是目前研究的热点菌群。大量研究者用体外和体内试验已证实一些乳酸菌具有降胆固醇的作用。在进行降胆固醇乳酸菌的筛选试验中,菌株除了需要具备产 BSH 和体外降胆固醇的能力外,还应适应人体肠道的特殊环境,需要对其耐酸、耐胆盐、疏水性、自凝聚力和代谢物抑菌性进行测定,以便得到性状优良的潜在益生菌。

3.2 基于以上试验背景,本研究从健康鲈鱼肠道中分离纯化得到一株降胆固醇能力较好的菌株 ZG2YLu05,其胆盐水解酶(BSH)粗酶活和胆固醇去除率分别为 0.82  $\mu\text{mol}/(\text{h}\cdot\text{mL})$ 和 50.09%,在现有的降胆固醇乳酸菌的研究中,其降胆固醇能力处于较高水平,具有一定的研究价值。经形态学观察和 16S rDNA 鉴定其为戊糖乳杆菌(*Lactiplantibacillus pentosus*)。耐酸、耐胆盐、疏水性、自凝聚力和代谢物抑菌性评价的试验结果表明,菌株 ZG2YLu05 具有适应肠道环境并发挥作用的潜力,是一株安全高效的降胆固醇乳酸菌,可作为潜在益生菌用于后期辅助降脂益生菌制剂的研发。由于本研究仅对乳酸菌的体外降胆固醇能力进行了探究,后期还需进行动物试验更进一步验证菌株 ZG2YLu05 降胆固醇的能力。

## 参考文献

- [1] Verhoeven V, Renard N, Makar A, et al. Probiotics enhance the clearance of human papillomavirus-related cervical lesions: a prospective controlled pilot study [J]. *European Journal of Cancer Prevention*, 2013, 22(1): 46-51
- [2] Ishimwe N, Daliri E B, Lee B H, et al. The perspective on cholesterol-lowering mechanisms of probiotics [J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2015, 59(1): 94-105
- [3] Hassan A, Din A U, Zhu Y, et al. Updates in understanding the hypocholesterolemia effect of probiotics on atherosclerosis [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2019, 103(15): 5993-6006
- [4] Bliznakov E G. Lipid-lowering drugs (statins), cholesterol, and coenzyme Q10. The Baycol case: a modern Pandora's box [J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2002, 56(1): 56-59
- [5] Taylor B L, Woodfall G E, Sheedy K E, et al. Effect of probiotics on metabolic outcomes in pregnant women with gestational diabetes: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials [J]. *Nutrients*, 2017, 9(5): 461-474
- [6] Reid G. Probiotics: definition, scope and mechanisms of action [J]. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 2016, 30(1): 17-25
- [7] 高玉荣,李大鹏,张凤琴,等.传统腊肠中降胆固醇降甘油三酯益生菌的筛选及鉴定[J].*食品科技*,2020,45(5):14-18  
GAO Yurong, LI Dapeng, ZHANG Fengqin, et al. Screening and identification of cholesterol-lowering and triglyceride-lowering probiotics in traditional sausage [J]. *Food Science and Technology*, 2020, 45(5): 14-18
- [8] WHO/FAO. Report of a joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria [J]. Córdoba, Argentina: WHO, 2001
- [9] Yue T, Yu W, Yuan T, et al. *Lactobacillus plantarum* LP104 ameliorates hyperlipidemia induced by AMPK pathways in C57BL/6N mice fed high-fat diet [J]. *Journal of Functional Foods*, 2020, 64: 103665
- [10] Fung W Y, Liong M. Evaluation of proteolytic and ACE-inhibitory activity of *Lactobacillus acidophilus* in soy whey growth medium via response surface methodology [J]. *LWT - Food Science and Technology*, 2009, 43(3): 563-567
- [11] Richardson D P, Eggersdorfer M. Opportunities for product innovation using authorised European Union health claims [J]. *International Journal of Food Science & Technology*, 2015, 50(1): 3-12
- [12] 黄燕燕,郭均,黎恒希,等.降胆固醇乳酸菌的体外筛选及其降胆固醇机理探讨[J].*食品科学*,2018,39(6):88-94  
HUANG Yanyan, GUO Jun, LI Hengxi, et al. *In vitro* screening of cholesterol-lowering lactic acid bacteria and discussion of their cholesterol-lowering mechanism [J]. *Food Science*, 2018, 39(6): 88-94
- [13] 李雅迪,柳陈坚,龚福明,等.具有降胆固醇功能益生菌的筛选及其体外降胆固醇机制初探[J].*食品与生物技术学报*,2019, 38(2):153-159  
LI Yadi, LIU Chenjian, GONG Fuming, et al. Screening of probiotics with cholesterol-lowering function and preliminary study on its *in vitro* cholesterol-lowering mechanism [J]. *Journal of Food and Biotechnology*, 2019, 38(2): 153-159
- [14] Fei T L, Lim S M, Ramasamy K. Cholesterol lowering by *Pediococcus acidilactici* LAB4 and *Lactobacillus plantarum* LAB12 in adult zebrafish is associated with improved memory and involves an interplay between npc111 and abca1 [J]. *Food & Function*, 2017, 8(8): 2817-2828
- [15] El-Gawad I A A, El-Sayed E M, Hafez S A, et al. The hypocholesterolaemic effect of milk yoghurt and soy-yoghurt containing *bifidobacteria* in rats fed on a cholesterol-enriched diet [J]. *International Dairy Journal*, 2004, 15(1): 37-44
- [16] Zhu Y, Li T, Din A U, et al. Beneficial effects of *Enterococcus faecalis* in hypercholesterolemic mice on cholesterol transportation and gut microbiota [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019, 103(7): 3181-3191

- [17] Jones M L, Martoni C J, Parent M, et al. Cholesterol-lowering efficacy of a microencapsulated bile salt hydrolase-active *Lactobacillus reuteri* NCIMB 30242 yoghurt formulation in hypercholesterolaemic adults [J]. British Journal of Nutrition, 2012, 107(10): 1505-1513
- [18] Jones M L, Martoni C J, Prakash S. Cholesterol lowering and inhibition of sterol absorption by *Lactobacillus reuteri* NCIMB 30242: a randomized controlled trial [J]. European Journal of Clinical Nutrition, 2012, 66(11): 1234-1241
- [19] Jones M L, Tomaro-Duchesneau C, Martoni C J, et al. Cholesterol lowering with bile salt hydrolase-active probiotic bacteria, mechanism of action, clinical evidence, and future direction for heart health applications [J]. Expert Opinion on Biological Therapy, 2013, 13(5): 631-642
- [20] Liong M T, Shah N P. Acid and bile tolerance and cholesterol removal ability of *Lactobacilli* strains [J]. Journal of Dairy Science, 2005, 88(1): 55-66
- [21] Liong M T, Shah N P. Effects of a *Lactobacillus casei* synbiotic on serum lipoprotein, intestinal microflora, and organic acids in rats [J]. Journal of Dairy Science, 2006, 89(5): 1390-1399
- [22] Frand A M, Klaver R M. The assumed assimilation of cholesterol by *Lactobacilli* and *Bifidobacterium bifidum* is due to their bile salt-deconjugating activity [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1993, 59(4): 1120-1124
- [23] Gilliland S E, Nelson C R, Maxwell C. Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1985, 49(2): 377-381
- [24] 滕跃. 降胆固醇益生菌的筛选及其改善高脂饮食小鼠脂代谢机制研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2020
- TENG Yue. Screening of cholesterol-lowering probiotics and its mechanism of improving lipid metabolism in mice with high-fat diet [D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2020
- [25] 玛丽娜·库尔曼, 包怡红. 传统酵素源高效降胆固醇菌株的筛选、鉴定及胆盐水解酶活性分析[J]. 中国食品学报, 2021, 21(1): 266-275
- MARINA Coleman, BAO Yihong. Screening, identification and analysis of bile salt hydrolase activity of traditional enzyme source for high-efficiency cholesterol-lowering strains [J]. Chinese Journal of Food Science, 2021, 21(1): 266-275
- [26] Tanaka H, Hashiba H, Kok J, et al. Bile salt hydrolase of *Bifidobacterium longum*-biochemical and genetic characterization [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(6): 2502-2512
- [27] 李妮. 降胆固醇乳酸菌的筛选及其降解机理研究[D]. 厦门: 集美大学, 2012
- LI Ni. Screening of cholesterol-lowering lactic acid bacteria and its degradation mechanism [D]. Xiamen: Jimei University, 2012
- [28] 贺珊珊, 鲍志宁, 林伟锋, 等. 降胆固醇和耐酸耐胆盐益生菌的筛选研究[J]. 现代食品科技, 2019, 35(8): 198-206
- HE Shanshan, BAO Zhining, LIN Weifeng, et al. Screening of probiotics for reducing cholesterol and acid and bile salt [J]. Modern Food Science and Technology, 2019, 35(8): 198-206
- [29] Gopal P K, Prasad J, Smart J, et al. *In vitro* adherence properties of *Lactobacillus rhamnosus* DR20 and *Bifidobacterium lactis* DR10 strains and their antagonistic activity against an enterotoxigenic *Escherichia coli* [J]. International Journal of Food Microbiology, 2001, 67(3): 207-216
- [30] 万婧惊, 罗曼, 黄仕新, 等. 一株具降胆固醇功能的海洋源植物乳杆菌的筛选及其益生性能分析[J]. 现代食品科技, 2020, 36(2): 122-128
- WAN Jingling, LUO Man, HUANG Shixin, et al. Screening of a marine-derived *Lactobacillus plant* with cholesterol-lowering function and analysis of its probiotic properties [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(2): 122-128
- [31] 王之怡, 钱焯, 陈怡然, 等. 腐乳来源乳酸菌的分离及其对斑马鱼生长发育的影响[J]. 生物学杂志, 2020, 37(5): 76-80
- WANG Zhiyi, QIAN Ye, CHEN Yiran, et al. Isolation of lactic acid bacteria from fermented bean curd and its effect on the growth and development of zebrafish [J]. Chinese Journal of Biology, 2020, 37(5): 76-80
- [32] 吕源玲. 耐酸耐胆盐益生菌乳酸菌的筛选与鉴定[J]. 食品与机械, 2017, 33(6): 42-45
- LYU Yuanling. Screening and identification of acid-tolerant and bile-salt-resistant probiotic lactic acid bacteria [J]. Food & Machinery, 2017, 33(6): 42-45
- [33] 陈仪婷, 张红星, 谢远红, 等. 降胆固醇乳酸菌的筛选鉴定及其耐酸耐胆盐性能研究[J]. 食品与发酵工业, 2018, 44(5): 29-33
- CHEN Yiting, ZHANG Hongxing, XIE Yuanhong, et al. Screening and identification of cholesterol-lowering lactic acid bacteria and their resistance to acid and bile salt [J]. Food and Fermentation Industries, 2018, 44(5): 29-33
- [34] Kotzamanidis C, Kourelis A, Litopouloutzanetaki E, et al. Evaluation of adhesion capacity, cell surface traits and immunomodulatory activity of presumptive probiotic *Lactobacillus* strains [J]. International Journal of Food



- Microbiology, 2010, 140(2): 154-163
- [35] 温贺,肖凤艳,段翠翠,等.植物乳杆菌Sc52益生特性评价及其在降血糖产品中的应用[J].食品科学,2018,39(6):148-154  
WEN He, XIAO Fengyan, DUAN Cuicui, et al. Evaluation of the probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* Sc52 and its application in hypoglycemic products [J]. Food Science, 2018, 39(6): 148-154
- [36] 何江波,姚志芳,吴国芳,等.羊瘤胃源乳酸菌的分离鉴定及其生物学特性分析[J].动物营养学报,2021,33(6):3365-3379  
HE Jiangbo, YAO Zhifang, WU Guofang, et al. Isolation and identification of rumen-derived lactic acid bacteria from sheep and analysis of their biological characteristics [J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2021, 33(6): 3365-3379
- [37] 王玉文,刘慧,李平兰,等.产胆盐水解酶乳酸菌的分离、鉴定及降解胆固醇机理的初步研究[J].食品科学,2006,10:215-218  
WANG Yuwen, LIU Hui, LI Pinglan, et al. Isolation, identification of lactic acid bacteria producing bile hydrolase and preliminary study on the mechanism of cholesterol degradation [J]. Food Science, 2006, 10: 215-218
- [38] 汪晓辉.降胆固醇乳酸菌的筛选、鉴定及降解机制的研究[D].杭州:浙江工商大学,2010  
WANG Xiaohui. Screening, identification and degradation mechanism of cholesterol-lowering lactic acid bacteria [D]. Hangzhou: Zhejiang Gongshang University, 2010
- [39] Pocock G, Richards C D, Richards D A. Human Physiology [M]. Oxford: Oxford University Press, 2013
- [40] Tsai C C, Lin P P, Hsieh Y M, et al. Cholesterol-lowering potentials of lactic acid [J]. Scientific World Journal, 2014, 2014(5): 690752
- [41] Kullak-Ublick G A, Stieger B, Meier P J. Enterohepatic bile salt transporters in normal physiology and liver disease [J]. Gastroenterology, 2004, 126(1): 322-342
- [42] Duary R K, Rajput Y S, Batish V K, et al. Assessing the adhesion of putative indigenous probiotic *Lactobacilli* to human colonic epithelial cells [J]. Indian J Med Res, 2011, 134(5): 664-671
- [43] Wadstrom T, Andersson K, Sydow M, et al. Surface properties of *Lactobacilli* isolated from the small intestine of pigs [J]. Applied Microbiology, 1987, 62(6): 513-520
- [44] 陈明,柯文灿,张娟,等.青藏高原牦牛酸奶中具有抗氧化活性乳酸菌的体内外益生特性[J].食品科学,2017,38(23):178-183  
CHEN Ming, KE Wencan, ZHANG Juan, et al. The probiotic properties of lactic acid bacteria with antioxidant activity in Qinghai-Tibet Plateau yak yogurt [J]. Food Science, 2017, 38(23): 178-183
- [45] 靳彩娟.高粘附性乳酸菌的筛选、鉴定及其表面疏水特性研究[D].扬州:扬州大学,2013  
JIN Caijuan. Screening and identification of highly adhesive lactic acid bacteria and study on its surface hydrophobicity [D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2013
- [46] 田宗民.抑致病菌益生菌菌株及其胞外多糖抗TGEV作用的比较分析[D].哈尔滨:东北农业大学,2015  
TIAN Zongmin. Comparative analysis of the anti-disease probiotic strain and its extracellular polysaccharide anti-TGEV effect [D]. Harbin: Northeastern Agricultural University, 2015

(上接第 246 页)

- [26] Sanz Y, Toldrá F. Purification and Characterization of an arginine aminopeptidase from *Lactobacillus sakei* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(4): 1980-1987
- [27] Cheng J R, Zhu M J, Liu X M. Insight into the conformational and functional properties of myofibrillar protein modified by mulberry polyphenols [J]. Food Chemistry, 2020, 308: 125592
- [28] Dos Santos B A, Campagnol P C B, Cavalcanti R N, et al. Impact of sodium chloride replacement by salt substitutes on the proteolysis and rheological properties of dry fermented sausages [J]. Journal of Food Engineering, 2015, 151: 16-24
- [29] 曹云刚.植物多酚对肉蛋白氧化稳定性和功能特性的影响机理及应用[D].无锡:江南大学,2016  
CAO Yungang. Effect of plant-derived polyphenols on oxidative stability and functional properties of meat proteins: mechanism and application [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2016
- [30] 邓大川.不同加工方式下兔肉中己醛和己酸含量的变化及其与脂肪酸氧化的相关性探究[D].重庆:西南大学,2018  
DENG Dachuan. Research on content change of hexanal and hexanoic acid of rabbit meat under different processing methods and its correlation with fatty acid oxidation [D]. Chongqing: Southwest University, 2018